微滴数字 PCR 技术应用进展

赵治国，崔强，赵林立，王海艳，李刚，刘来俊，敖威华，马彩霞

（内蒙古出入境检验检疫局检验检疫技术中心 内蒙古 呼和浩特 010020）

摘要 微滴数字 PCR 技术是数字 PCR 技术的一种，是近年来分子生物学领域的新型革命性技术，其特点是高度灵敏、绝对定量及高效方便等。目前，该技术在微生物检测、转基因检测、疾病检测以及质检领域的研究和应用中已凸显优势，随着微滴数字 PCR 仪的普及，该技术必将被广泛应用于生命科学的各个领域。

关键词 微滴数字 PCR 技术 绝对定量 应用

随着经济社会的发展，人类越来越重视生活质量的提高，而身体健康和食品安全是保障生活质量的最基础条件。目前，全球环境恶化、病原微生物种类繁多且变异频繁、利益驱使下食品掺假事件屡见不鲜、食品安全事件层出不穷、转基因食品等新型食品是否安全尚无定论等种种问题不断挑战着人类生存底线，也急需新型、准确检测技术的问世，以早发现、早预防的方式保障人类食品安全和身体健康。

聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）技术的出现，为生物学、医学及食品卫生学等提供了良好的手段，解决了大量的科学难题，并在人类生产、生活中得到广泛应用。近年来，微滴数字 PCR（Droplet Digital PCR，ddPCR）的问世，使相关研究手段和检测方法实现了巨大的跨越，其被广泛用于科学及生活的诸多领域。文章就此新型技术的应用进展做简要论述。

1 微滴数字 PCR 技术简介

PCR 扩增完成后，利用微滴分析仪逐个对每个微滴进行检测，有荧光信号的微滴判与比例即可得出靶分子的起始拷贝数或浓度，从而实现对最初反应体系中核酸靶分子数的绝对定量。

收稿日期：2016-12-28 修回日期：2017-01-19

国家质检总局科技计划项目 （No. 2016IK165 ）资助.

通讯作者：赵治国（1983.3-），高级兽医师，博士。Email：zhaozhiguo303@163.com.

1.1 数字 PCR 技术产生

1985年，美国科学家 Kary Mullis 发明了 PCR 技术[1]，1988年，世界上第一台 PCR 仪问世，极大地促进了该实验技术的广泛应用，如生物学、医学、遗传学、考古学等等，该技术快速促进了生命科学的发展。1993年，Kary Mullis 也因此荣获诺贝尔化学奖。1992年，日本科学家 Higuchi 等提出了比传统 PCR 法更快速、灵敏的实时 PCR 方法[2]，对核酸的检测、分析由定性发展到了定量（相对定量），1996年，美国 ABI 公司推出第一台商业化荧光定量PCR仪，使该技术的应用迅速普及，该技术被称为"第二代 PCR 技术"。1992年，澳大利亚Alec Morley教授首次提出极限稀释 PCR，建立了数字 PCR 实验流程[3]，1999 年，美国科学家 Bert Vogelstein 首次确提出数字 PCR 这一术语[4]，并进行了相关研究， 2006年，美国 Fluidigm 公司推出了第一台商品化数字 PCR 系统。实现了核酸绝对定量检测，该技术也被成为"第三代 PCR 技术"。

1.2 数字 PCR 系统分类

数字 PCR 系统发展过程中，出现了 3 种类型，即微孔板数字 PCR 系统、微流控芯片数字 PCR 系统和微滴数字 PCR 系统。微孔板数字 PCR 系统是在不锈钢芯片上刻蚀几千个微反应室，微量扩增体系在每个微反应室中分别扩增，该系统的缺点是随着微孔数量的成倍增加，每孔的反应体积从微升级降至纳升级，须通过自动点样仪加液，实验成本和操作复杂性相对较高。微流控芯片数字 PCR 系统是在微流体技术、纳米制造技术和微电子技术等大力发展的基础上产生的，通过微流控芯片技术可使样品流体快速准确分布于若干个独立单元，此方法通量高、成本低、效果好。微滴数字 PCR 系统利用油包水技术将其“分割”为数万个纳升级的微滴，每一个微滴都是一个独立的 PCR 反应体系，该方法通量高，操作简单、成本低，是理想的数字 PCR 平台。

1.3 微滴数字 PCR 技术原理

ddPCR 系统在传统的 PCR 扩增前将一个大的反应体系进行微滴化处理，即利用油包水技术将其“分割”为数万个纳升级的微滴，每个微滴或不含待检核酸靶分子，或含有至少一个待检核酸靶分子，且每个微滴都是一个独立的 PCR 反应体系。读为“1”，没有荧光信号的微滴判读为“0”，根据泊松分布原理及阳性微滴的个数

1.4 微滴数字 PCR 技术特点

ddPCR 技术能够把不同DNA模板分隔在不同的油包水小水滴中，有效避免反应过程中不同引物间、产物间的相互杂交和不同产物之间的竞争抑制[8]，因此能够得到较好的扩增效率，也可实现不同模板的同时扩增。ddPCR 体系所需样本量很低，适合珍贵样本或核酸存在降解的样本扩增。该方法定量的结果不再依赖于 Cq 值而直接给出靶序列的起始拷贝数浓度，实现真正意义上的绝对定量，无需阳性对照便可得出结果，也可避免实验中阳性对照污染。由于 ddPCR 降低了对反应扩增效率的要求，采取终点法判读的方法，可以很好的胜任稀有变异的检测工作。ddPCR 采用一种全新的方式进行核酸分子的定量，与传统 PCR、定量 PCR 相比，其结果的精确度、准确性和灵敏度更佳。

2 微滴数字 PCR 技术应用

2.1 微生物检测

随着分子生物学的发展， PCR 法、荧光定量 PCR 法等检测方法已经被广泛用于微生物快速检测、分类与鉴定，其敏感、特异、简便、快速的优点早已被研究人员广泛认可，且很多方法已经标准化。ddPCR 法的出现，为微生物分子生物学定量检测开辟了新途径，大量研究也随之展开。Michael 等分别用 ddPCR 法、定量 PCR 法和传统的平叛培养法对水样中沙门氏菌、空肠弯曲杆菌和单核细胞增生李斯特氏菌进行了检测和比较，结果显示，平板培养法仅对采样中期与后期的沙门氏菌实现了检出，而对空肠弯曲杆菌和单增李斯特菌没有检出；定量 PCR 法也存在漏检的情况；ddPCR 法对三种细菌在不同时间点采集的水样中都能实现检出[9]。Zhao Hui 等利用 ddPCR 法分别对副痘病毒属所有病毒、口疮病毒、伪牛痘病毒和牛丘疹性口炎病毒进行了检测，结果显示 ddPCR 法的检测灵敏度为 10 个病毒分子[10]。研究人员利用 ddPCR 技术对地表水、粪便、土壤等中的微生物做了大量研究，也对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌进行了研究，事实证明该方法快速、敏感、可靠，

且能做到绝对定量[11-14]。

2.2 转基因检测

长期以来，荧光定量 PCR 法在转基因检测中承担着重要角色，但在检测过程中该方法也存在一些难以突破的瓶颈。一是荧光定量 PCR 法对低含量转基因成分检测结果可靠性差，容易出现漏检；二是荧光定量 PCR 法的定量检测必须依据转基因标准物质的标准曲线进行，而转基因标准物质相对难以获得；三是荧光定量 PCR 法容易受样品中某些抑制 PCR 反应的成分影响，造成检测结果不理想。而 ddPCR 技术恰好可以克服以上弊端，非常适合转基因定量检测的应用。Dany Morisset 等证实 ddPCR 技术对低丰度核酸样本检测重复性好，且对抑制成分不敏感，该方法在高通量转基因成分检测中检测成本也相对更低，可作为转基因成分常规检测技术[15]。

2.3 地沟油检测

在利益驱使下，不法商家利用地沟油以次充好的现象非常普遍，而由劣质动物皮、肉、内脏等加工提炼后产出的油是地沟油的重要来源之一。利用 PCR 技术从动物源性地沟油中检测生物内源性成分是值得研究的思路，但由于经过剧烈条件提炼产生的地沟油所含的 DNA 成分的结构受到严重破坏，其数量本来已经极其稀少，再以一定比例掺入到植物油中， DNA 含量就少之又少了，加大了地沟油中微量的、不完整的DNA检测难度。李浩等通过试验证实 ddPCR 技术与实时荧光定量 PCR 技术相比，检出限更低，灵敏度更高，结果判定更准确，有利于提高地沟油检出率[16]。

2.4 掺假成分检测

目前，肉制品掺假检测主要通过普通 PCR 定性检测和荧光 PCR 定量检测完成。资料显示，Cai Yicun 等利用 ddPCR 法建立了肉制品的重量(mg)、DNA 重量(ng)及特定目标基因的拷贝数(copies/uL)之间良好的线性关系，从而检测肉类样品中猪肉和鸡肉的准确重量及含量，并利用该方法对超市中买到的 11 种不同的肉制品中鸡肉和猪肉的比例进了实际检测，结果表明这种方法具有良好的应用前景[17]。

ddPCR 法可以灵敏地检测到肉制品掺假种类，甚至准确定量掺假比例，这是其它方法难以达到的。

2.5 基因组拷贝数变异

基因拷贝数变异 (copy number variation，CNV)是一种大小介于 1 kb 到 3 Mb 之间的DNA 片段的缺失、重复、倒位和易位，广泛存在于多种生物基因组中，被认为是个体间基因差异的重要来源[18]。由于 CNV 对生物体抗病性及优良性状的影响较大，近年来成为疾病与遗传育种研究的热点。Benjamin 等首次应用 ddPCR 技术在高通量样品条件下对二代测序技术（Next Generation Sequencing, NGS）进行验证，之后，利用 ddPCR 与NGS、Array联用来进行 CNV 位点发现及确认越来越被认可[19]。Boettger 等首次将 ddPCR 技术应用于等位基因的不平衡表达分析，并得出了 ddPCR 试验结论与 NGS结论高度吻合[20]。

2.6 疾病应用

ddPCR 技术在疾病病因、诊断及治疗效果分析研究中已被普遍应用，且效果显著。在对一名出生时即携带艾滋病病毒（Human Immunodeficiency Virus, HIV）的婴儿治疗过程中，Deborah 等使用 ddPCR 技术持续检测该婴儿血液中 HIV 核酸水平，最终证实了全球首例“功能性治愈”艾滋病患儿[21]，而这是其它检测方法难以达到的。Sedlak 等利用 ddPCR 技术对以染色体重组整合方式存在的人类疱疹病毒 6 型（Human Herpes virus type 6, HHV-6）临床病人血浆进行检测，检测灵敏度高达 100%，显示了该方法在临床检测的巨大应用前景[22]。研究人员利用 ddPCR 法对沙眼衣原体、脊髓病/热带痉挛性瘫痪病及引发手足口病的多种肠道病毒等进行了检测，均收到了较好的效果[23-25]。

3 展望

未来生物技术的发展，将由定性研究转为定量研究，由相对定量研究到绝对定量研究，由对表观特征的研究深入到对调控因子的研究，由对大量物质的研究转为对微量物质的研究，不断追求准确、灵敏、高效、快速的研究思路。ddPCR 技术问世的几年来，以其能做到绝对定量和高灵敏性等突出的优点，赢得了全球学者的广泛关注，在众多领域中的应用也证实了其是推动科学进步的革命性技术。目前

ddPCR 技术在实际应用中也存在一些不足，如数字 PCR 技术的灵敏度（分辨率）和准确性有待进一步提高和优化，仍需要用传统方法做对照[26]；仪器设备价格相对较高，对该技术的快速推广有一定制约；多数数字 PCR 仪配套试剂不开放，试剂价格高昂。随着制造业的发展、微滴个数字 PCR 仪的改进与普及，该技术必将被应用于生命科学的各个领域。

Application progress of the technology of droplet digital PCR

Zhao Zhi-guo,Cui Qiang,Zhao Lin-li,Wang Hai-yan,Li Gang,

Liu Lai-jun,Ao Wei-hua,Ma Cai-xia

(The inspection and quarantine technology center of Inner Mongolia entry-exit inspection and quarantine bureau,

Inner Mongolia, Hohhot, 010020)

Abstract Droplet digital PCR is a type of digital PCR，which was a new revolutionary technology of Molecular biology in recent years, its characteristic is highly sensitive, absolute quantitative, efficient, convenient, and so on. At present, the technology have been applied in microbiological detection, genetically modified detection, disease detection and quality inspection area, and its advantage was very obvious. Along with the popularization of droplet digital PCR system, the technology will be widely applied in various fields of life science.

Key Words Droplet digital PCR, absolute quantitative, application

参考文献

[1] Saiki R K, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.Science,1985,230(4732):1350-1354.

[2] Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S, et a1. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. Bio Technology,1992,10(4):413-417.

[3] Sykes P J, Neoh S H, Morley A A, et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. BioTechniques, 1992,13 (3): 444-449.

[4] Bert V, Kenneth W K. Proceedings of the National Academy of Didital PCR. Sciences, 1999, 96(8):9236 -9241.

[5] Morrison T, Hurley J, Garcia J, et al. Nanoliter high throughput quantitative PCR. Nucleic Acids Res, 2006, 34 (18)：e123.

[6] Ottesen EA, Hong JW, Quake SR, et al. Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria.Science,2006,314(5804):1464–1467.

[7] Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, et al. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. Analytical Chemistry, 2011,83(17):6474-6484.

[8] 胡瑞丽,杜亚楠,赵凯等. 微滴PCR技术的研究进展. 农村经济与科技,2016,27(14):290- 291.

Hu R L, Du Y N, Zhao K, et al. The research progress of droplet PCR technology. Rural economy and technology, 2016,27(14):290- 291.

[9] Michael J, Rothrock J R, Kelli L, et al. Quantification of Zoonotic Bacterial Pathogens within Commercial Poultry Processing Water SamplesUsing Droplet Digital PCR. Advances in Microbiology, 2013,3(5),403-411.

[10] Zhao H, Kimberly W, Inger K, et al. Specific qPCR assays for the detection of orf virus, pseudocowpox virus and bovine papular stomatitis virus. Journal of Virological Methods, 2013,194(12):229 -234.

[11] Nejc R, Dany M, Ion G A, et al. One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014,406(3): 661-667.

[12] Sophia A, Kevin S, Micah M, et al. Detection of Low-concentration Host mRNA Transcripts in Malawian Children at Risk for Environmental Enteropathy. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2013,56(1):66-71.

[13] KaShonda K, Angela C, Phillip B, et al. Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus by A Duplex Droplet Digital Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical microbiology, 2013,51(7):2033-2039.

[14] Tae G K, So Y J, Kyung S C, et al. Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil. Appl Microbiol Biotechnol, 2014,98(13):1-4.

[15] Dany M, Dejan S, Mojca M, et al. Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. Plos One, 2013,8(5):1-9.

[16] 李浩,杨冬燕,杨永存等. 运用微滴式数字PCR 技术鉴定潲水油的初步研究. 中国保健营养,

2013,5(5): 22-23.

Li H, Yang D Y, Yang Y C, et al. The preliminary research of pigwash oil determination by droplet digital PCR technology. China's health care and nutrition, 2013,5(5): 22-23.

[17] Cai Y C, Li X, Lv R, et al. Quantitative Analysis of Pork and Chicken Products by Droplet Digital PCR. BioMed Research International Volume, 2014,2014(8):1-6.

[18] Feuk L, Carson A R, Scherer S W. Structural variation in the human genome. Nature Reviews Genetics, 2006,7(2):85-97.

[19] Benjamin J H, Kevin D N, Donald A M, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Analytical Chemistry, 2011,83(22): 8604-8610.

[20] Boettger L M, Handsaker R E, Zody M C, et al. Structural haplotypes and recent evolution of the human 17q21.31 Region. Nat Genet, 2012,44(8): 881-885.

[21] Deborah P, Hannah G., Carrie Z, et al. Absence of Detectable HIV-1 Viremia after Treatment Cessation in an Infant. NewEngland Journal of Medicine, 2013, 369(19): 1828-1835.

[22] Sedlak R H, Cook L, Huang M L, et al. Identification of Chromosomally Integrated Human Herpes virus 6 by Droplet Digital PCR. Clinical Chemistry, 2014,60(5):765–772.

[23] Chrissy H R, Anna L, Sandra M G., et al. Development and Evaluation of a Next-Generation Digital PCR Diagnostic Assay for Ocular Chlamydia trachomatis Infections. Journal of Clinical Microbiology, 2013,51(7):2195-2203.

[24] Yan L, Edmund L, Eng L T, et al. Droplet digital PCR as a useful tool for the quantitative detection of Enterovirus71. Journal of Virological Methods, 2014, 207(7): 200–203.

[25] Giovanna S B, Raya M, Emily C L, et al. Digital droplet PCR (ddPCR) for the precise quantification of human T-lymphotropic virus 1 proviral loads in peripheralblood and cerebrospinal fluid of HAM/TSP patientsand identification of viral mutations. Journal of neurovirology, 2014,20(4):341-351.

[26] 林彩琴，姚波. 数字 PCR 技术进展.化学进展,2010,24(12):2415-2423.

Lin C Q, Yao B. Recent advance in digital PCR. Progress in Chemistry, 2010,24(12):2415-2423.